

## The Comparison of the Sensitivity of Viral Detection Methods in Certain Vegetable Seeds

İsmail Can PAYLAN Semih ERKAN Müge ERGÜN Ayşe ÇANDAR

Ege Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü, 35100 İzmir/Türkiye, ismail.paylan@ege.edu.tr

Accepted for publication April 24, 2013

### ABSTRACT

The present study was conducted to compare the sensibility of different methods which are used to detect the agents of viral diseases in seeds of some vegetables which are important for fresh consumption and seed production in Turkey. For the study in question; total 43 seed samples were collected from the growers and seed companies and biological, serological and molecular methods were used for the detection of viral agents in these samples. The data from the experiments showed that 15 seed samples were not infected with any virus according to the results of all detection methods (DAS-ELISA, RT-PCR, mechanical inoculation to test plants and symptomatology). On the other hand, their viral infection could not be detected by other methods, although 5 seed samples had some visual symptoms. Based on research results, the viral agents have determined in a total of 23 samples and all of the 23 infected samples by various viruses (%100) were detected by RT-PCR method. Besides, viral symptoms were observed in the 22 of 23 samples tested by DAS-ELISA (%96), 18 of 19 samples inoculated herbaceous test plants (% 95) and 7 of the 23 infected seed samples with various viruses (%30).

**Keywords:** Vegetable, seed, virus, diagnosis method

### GİRİŞ

Bitkisel üretimde birim alandan alınan verimin artırılması ve kaliteli ürün elde edilmesini sağlayan faktörlerden birisi tohumdur. Tohumlar besin olarak kullanılmalarının yanında, bitkilerin üretilmeleri için başlangıç materyali olarak da görev yapmaktadırlar. Sürekli artan dünya nüfusunun yeterli düzeyde beslenebilmesi için gerekli ürün artışını sağlamada, kalite ve yüksek verim gibi özelliklerin yanında sağlıklı tohum ve üretim materyali kullanmak büyük önem taşımaktadır. Beslenme amacı ile yetiştirilen ürünlerin %90'a yakın bir kısmının tohum ile üretilmeleri tohum sağlığı konusunun önemini göstermektedir (Erkan, 1998).

Türkiye dünyada sebze üretiminde lider ülkelerden biri durumundadır. FAO (2011) verilerine göre, ülkemiz dünyada karpuz, kavun, biber ve hıyar üretiminde ikinci, domates ve patlıcan üretiminde de dördüncü sırada yer almaktadır. Çin, ABD, Hindistan, Mısır, İran ve İspanya ülkemiz ile birlikte dünyada sebze üretiminde önde gelen ülkeler arasında yer almaktadırlar.

Ülkemizdeki sebze üretim miktarlarını göz önünde bulundurduğumuzda en çok üretilen sebzelerin domates, karpuz, biber, hıyar ve kavun olduğu görülmektedir. Bu ürünleri ise patlıcan, lahana, taze fasulye ve marul izlemektedir (DİE, 2011a; DİE, 2011b). Ülkemizde yaklaşık 400 milyon \$'lık tohum ticaret pazarının 165 milyon doları sebze ve patates tohumu ithalatına harcanmaktadır. Ülkemizde 2004-2009 yılları arasında toplam sebze tohum dışalımını dikkate alırsak, ödenen yıllık döviz toplamının bu dönemde 50 milyon \$'dan 2008 yılında yaklaşık 96 milyon \$'a kadar çıktığı ve 2009 yılında ise bu rakamın 80 milyon \$'ı bulunduğu görülmektedir. 2009 yılı verilerine

## THE COMPARISON OF THE SENSIVITY OF VIRAL DETECTION METHODS IN CERTAIN VEGETABLE SEEDS

göre toplam 1.285 ton sebze tohumu ithalatı gerçekleştirilmiştir (TSÜAB, 2010). Ülkemizde tohumluk ihracatı yıllara göre büyük artışlar göstermiştir ve 2004 yılında toplam 126 ton sebze tohumu ihracatı yapılırken, 2007 yılında bu rakam yaklaşık 15 kat artarak 1.485 tona ulaşmıştır. 2008 yılı ve 2009 yıllarında sebze tohumu ihracatında düşüş olduğu görülmüştür (TSÜAB, 2010).

Son yıllarda ülkeler arasında hızla artan tohum ticareti, tohum temin etmede önemli bir yol olarak karşımıza çıkmaktadır. Ülkeler arasında işbirliğinin artması ve ulaşım olanaklarının kolaylaşması sonucunda dünyada tohum endüstrisi ve ticareti oldukça gelişme göstermiştir. Tohum sağlamadaki bu çeşitlilik hastalık etmenlerinin taşınmalarını da hızlandırmıştır. Enfekteli tohumlar bir bölgede hastalıkların artışına neden olduğu gibi, ülkeler arası tohum ticaretinin gelişmesiyle bu hastalıkların çok uzak mesafelere yayılabilmesine imkan vermektedir. Sonuçta bu etmenlerin daha önce görülmedikleri üretim alanlarına girmeleri ve hastalık oluşturmaları da mümkün hale gelebilmektedir (Çiçek and Yorgancı, 1991).

İnsanlığın en önemli gıda kaynakları arasında yer alan sebzelerde viral etmenler büyük kayıplara yol açabilmektedir. Virüs hastalıkları bitki gelişimi ve verimi üzerinde olumsuz etkilere neden olmasının yanında, virüs vektörleriyle yapılan mücadele ile de ekonomik zararlara yol açmaktadır. Sebzelerde virüs hastalıklarının görünümü ve şiddeti virüs, konukçu, vektör ve çevre koşulları dörtgeni ilişkisine bağımlı olarak yıllara göre değişkenlik göstermektedir. Ayrıca, bu etmenlere karşı diğer patojen gruplarının önlenmesi için sıkça başvurulan kimyasal savaş yöntemlerinin uygulanma şansının olmaması ve diğer kültürel kontrol yöntemlerinin de üretici tarafından yeterli düzeyde bilinmemesi virüslerden kaynaklanan kayıpların artmasına neden olmaktadır.

Viral hastalık etmenlerinin tohumla taşınmaları yüksek oranlarda gerçekleşebilmektedir. Virüsler ile enfekteli tohum ekildiğinde, vektörlerin aracılığı ile hastalıklar kolaylıkla yayılabilmekte ve sonuçta üründe %100'e kadar varan oranlarda enfeksiyon ortaya çıkabilmektedir. ABD'nin Montana eyaletinde arpalarda tohum kaynaklı *Barley stripe mosaic hordei virus* (BSMV)'nin neden olduğu ekonomik zararın 1953-1970 yılları arasında 30 milyon \$'dan fazla olduğu belirtilmiştir (Carroll, 1983). 2002 yılına kadar epidemiyolojisinde tohumla taşınımının önemli olmadığı düşünülen, sadece tohumla taşınabildiği izlerine rastlanan kabakgillerin yıkıcı patojeni *Zucchini yellow mosaic poty virus* (ZYMV)'nin *Cucurbita pepo* var. *styriaca* tohumlarında %5'ten daha fazla oranda taşınabildiği ve virüsün bu düzeydeki tohumla taşınma oranının bile %99'dan fazla ürün kaybına neden olabildiği belirtilmiştir (Riedle-Bauer et al., 2002).

Bir virüsün tohumla taşınması düşük oranda bile olsa, bu tohumların üretimin başlangıcında hastalık kaynağı oluşturması yönünden önemi fazladır (Nienhaus, 1976). Diğer taşınma yolları ile yayılmaları mümkün olabilen tohum kaynaklı virüs hastalıklarının kısa sürede büyük oranlarda artış gösterdikleri de belirtilmektedir. Ayrıca, tohumla taşınma dar konukçu dizisine sahip virüsler için vejetasyon dönemleri arası geçişte bir yol olarak kullanılmaktadır (Erkan, 1998).

Virüs hastalıklarından korunmada en önemli yol sağlıklı ve temiz üretim materyali kullanılmasıdır. Tohumlarda bulunan virüslerin belirlenmesi bu hastalıklara karşı alınabilecek önlemlerin temelini oluşturmaktadır. Yüzden fazla virüs hastalığı tohumla taşınmaktadır ve daha önce yapılan bazı araştırmalarda sertifikalı tohumların bile viral etmenlerle enfekteli oldukları belirlenmiştir. Bu düşünceden hareketle, bu çalışmada 43 adet sebze tohumunda (domates, karpuz, kavun, hıyar, biber ve kabak) bulunan virüslerin saptanabilmesi için simptomatoloji, test bitkilerine inokulasyon, DAS-ELISA ve RT-PCR yöntemlerinden yararlanılmıştır. Ayrıca, sözü edilen yöntemlerin virüsleri saptamadaki başarı oranları değerlendirilmiştir.

### MATERYAL VE METOD

#### Tohum Örnekleri

Bu çalışma için öncelikle ülkemizde üretilen ve ekonomik öneme sahip olan sebze türleri belirlenmiş, çeşitli kuruluşlardan, firma ve üreticilerden belirlenen sebzelerin tohumları temin edilmiştir. Araştırmalarda 20 domates, 5 karpuz, 5 kavun, 5 hıyar, 5 biber ve 3 kabak olmak üzere toplamda 43 tohum örneği kullanılmıştır.

### Tohumlardaki Belirtilerin İncelenmesi (Simptomatoloji)

Tohumlardaki belirtileri belirlemek amacı ile tohum örnekleri tohum renginde ve şeklinde değişme, tohum büyüklüğünde azalma, tohum kabuğunda buruşma, beneklenme, leke, çizgi, band, nekroz vb. simptomların varlığı yönünden görsel olarak incelenmiştir (Erkan, 1998).

### Biyolojik Testler

Mekanik inokulasyon çalışmalarında yaygın biçimde kullanılan otsu test (indikatör) bitkileri, *Chenopodium amaranticolor* Coste&Reyn. (6 yapraklı devre), *C. quinoa* Quin. (6 yapraklı devre), *Datura stramonium* L. (2 yapraklı devre), *Gomphrena globosa* L. (4-8 yapraklı devre), *Nicotiana glutinosa* L. (4 yapraklı devre), *N. tabacum* L. cv. Samsun (4 yapraklı devre), *N. tabacum* L. Cv. Xanthi (4 yapraklı devre), *N. tabacum* L. cv. Maden (4 yapraklı devre) şeklindedir (Noordam, 1973; Gümüş, 1998).

Biyolojik testler için kullanılan test bitkileri iklim odasında yetiştirilmiştir. Yetiştirme ortamı olarak kullanılan harç toprak, gübre ve kum (1:1:1) karışımından oluşmuştur. Test bitkilerinin tohumları küvetlere ekilmiş ve tohum ekimi yapılan test bitkileri 4000-6000 lüks ışık şiddeti, 16 saat/gün aydınlanma periyodu ve 20-24 °C sıcaklığa sahip olan iklim odası koşullarında yetiştirilmiştir (Nogay, 1983; Matthews, 1991). Test bitkileri uygun gelişme dönemlerine ulaştıkları zaman tohum büyüklüğüne göre 50-500 adet tohum içeren sebze tohum örneklerinden %0.1 sodyum sülfite içeren 0,01 M fosfat tamponu (pH=7.0) kullanılarak (1/5; g/v) hazırlanan ekstraktlar belirlenmiş test bitkilerine mekanik inokulasyon yöntemi ile inokule edilmiştir. İnokulumun içine enfeksiyon oluşumunu kolaylaştırmak amacı ile celite ilave edilmiştir ve cam spatül yardımıyla test bitkilerine inokulasyon yapılmıştır. İnokulasyondan 1-2 dakika sonra test bitkilerinin yaprakları çeşme suyu ile yıkanmıştır. Bu bitkilerde belirti oluşup oluşmadığı inokulasyon sonrasında gözlemlenmiş ve oluşan belirti tipleri değerlendirilerek, fotoğrafları çekilmiş ve kaydedilmiştir (Yorgancı, 1975; Nogay, 1983; Matthews, 1991).

### Serolojik Test Yöntemi (DAS-ELISA)

Tohumlardaki viral etmenlerin belirlenmesi amacı ile toplanan tohum örneklerine Çizelge 1’de görülen viral etmenler için serolojik yöntemlerden DAS-ELISA testleri uygulanmıştır.

Çizelge 1. Sebze tohumlarında serolojik ve moleküler yöntemler ile testlenen viral etmenler

Viral Etmen	Akronim	Test Yöntemi	
		Serolojik	Moleküler
<i>Alfalfa mosaic alfamovirus</i>	AMV	+	+
<i>Arabidopsis mosaic nepovirus</i>	ArMV	+	+
<i>Cucumber green mottle mosaic tobamovirus</i>	CGMMV	+	+
<i>Cucumber mosaic cucumovirus</i>	CMV	+	+
<i>Potato Y potyvirus</i>	PVY	+	+
<i>Squash mosaic comovirus</i>	SqMV	+	+
<i>Tobacco mosaic tobamovirus</i>	TMV	+	+
<i>Tobacco ringspot nepovirus</i>	TRSV	+	+
<i>Tobacco streak ilarvirus</i>	TSV	+	+
<i>Tomato black ring nepovirus</i>	TBRV	+	+
<i>Tomato mosaic tobamovirus</i>	ToMV	+	+
<i>Tomato ring spot nepo virus</i>	ToRSV	+	+
<i>Tomato spotted wilt tospovirus</i>	TSWV	+	+
<i>Zucchini yellow mosaic potyvirus</i>	ZYMV	+	+
<i>Watermelon mosaic potyvirus</i>	WMV	+	+

DAS-ELISA testlerinin uygulanması Clark ve Adams, (1977) ve Erkan ve ark. (1995)’a göre yapılmıştır. Buna göre ELISA tabaklarının her bir çukuruna kaplama tamponunda 1:1000 (Bioreba firması ticari kitleri), 1:200 (Agdia firması ticari kitleri), 1:100 (Loewe firması ticari kitleri) oranında seyreltilmiş olan IgG’den 200 µl

## THE COMPARISON OF THE SENSIVITY OF VIRAL DETECTION METHODS IN CERTAIN VEGETABLE SEEDS

eklenerek 37°C'de 4 saat inkube edilmiştir. Ardından, ELISA tabakları yıkama tamponu ile yıkanarak 3 dakika beklenmiş ve bu işlem 4 kez tekrarlanmıştır. Ekstraksiyon tamponu ile 1/10 (g/ml) oranında seyreltilerek hazırlanan tohum ekstraktı örnekleri, pozitif ve negatif kontrollerin her bir çukura 200 µl olacak miktarda eklenerek 4°C'de bir gece inkube edilmesinden sonra, yukarıda anlatıldığı şekilde tekrar yıkama yapılmıştır. Yıkama işleminde sonra ise konjuge edilmiş IgG, konjugat tamponu içerisinde 1:1000 (Bioreba firması ticari kitleri), 1:200 (Agdia firması ticari kitleri), 1:100 (Loewe firması ticari kitleri) oranında seyreltilip her bir çukura 200 µl eklenerek 37 °C'de 4 saat inkube edilmiş, yukarıda anlatıldığı şekilde yıkama yapılmış ve substrat çözeltisine 1mg/ml olacak şekilde substrat (paranitrofenilfosfat) her bir çukura 200 µl konularak oda sıcaklığında inkube edilmiştir.

Sonuçlar ELISA reader cihazı ile 405 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak değerlendirilmiştir (Erkan ve ark., 1995). Kontrolün absorpsiyon değerinin 2 katı ve daha üstünde olan örnekler enfekteli olarak değerlendirilmiştir.

### Moleküler Test Yöntemi (RT-PCR)

Tohum örneklerine Çizelge 1'deki viral etmenler için moleküler test yöntemlerinden RT-PCR (Reverse-Transcriptase Polimerase Chain Reaction) testleri uygulanmıştır. Testler örnek hazırlığı, TNA (total nükleik asit) ekstraksiyonu, cDNA (komplementer DNA) sentezi ve RT-PCR uygulaması olmak üzere dört aşamada gerçekleştirilmiştir. İlk olarak, sebze tohumu örnekleri total nükleik asit ekstraksiyonu yapılmak üzere tohum büyüklüğüne göre 50-500 adet tohum olarak naylon torbalar içerisine konulmuştur. Bu torbalar üzerine temin edildiği yer, tarih ve çeşit isimleri yazılmıştır. Tohum örneklerine karşı testler ISTA standartları çerçevesinde uygulanmıştır (ISTA, 2007). Ardından, TNA ekstraksiyonu aşamasına geçilmiştir.

TNA ekstraksiyonunda her izolat için yaklaşık 1g tohum kullanılarak, 10 ml %1 mercapto-ethanol içeren ekstraksiyon tampon çözeltisi varlığında steril örnek poşetleri içinde homojenize edilmiştir. Tüpler ısıtıcıda 70 °C 10 dakika inkube edildikten sonra 5 dakika buzda bekletilmiştir. Daha sonra örnekler 14000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilmiş, üst sıvıdan 300 µl alınarak yeni tüplere aktarılmıştır. Tüplere 150 µl ethanol, 300 µl 6M NaI, 25 µl silika süspansiyonu eklenerek 10 dakika oda sıcaklığında inkubasyona bırakılmıştır. Tüpler 6000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildikten sonra üst sıvı atılmış tüpün içinde kalan silika partiküllerinin yıkanması için 500 µl yıkama tampon çözeltisi eklenmiştir. Bu işlemden sonra tüpler 6000 rpm'de santrifüj edilmiştir. Yıkama işlemi iki kere yapılmıştır. Yıkamadan sonra silika partikülleri içeren tüplere 150 µl RNase'dan arı steril su eklenmiştir. 70°C'de 4 dakika ısıtıcıda inkube edilen tüpler 13000 rpm'de 3 dakika santrifüj edilmiştir. Tüpün üst kısmında kalan sıvıdan 145µl alınarak yeni tüplere aktarılmış ve TNA ekstraksiyonu tamamlanmıştır. Örnekler cDNA sentez ve PCR uygulamaları yapılmaya kadar -20°C'de derin dondurucuda saklanmıştır (Foissac ve ark., 2001).

Daha sonra TNA ekstraksiyonu yapılmış olan örneklerle komplementer DNA (cDNA) sentezi gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla Fermentas firmasından temin edilen cDNA sentez kitleri kullanılmış ve firmanın belirttiği prosedür doğrultusunda cDNA sentezleri gerçekleştirilmiştir. Bu yöntemde göre ilk olarak eppendorf tüplerin içerisine 0,1-5 µg total RNA, 1 µl random hexamer primer konulmuş ve DEPC su ile 12 µl'ye tamamlanmıştır. 70°C'de 5 dakika inkubasyon uygulandıktan sonra tüpler buz üzerine konulmuş ve içlerine sırasıyla 4 µl 5X reaction buffer, 1 µl Ribolock Ribonuclease inhibitor, 2 µl 10mM dNTP mix eklenmiştir. Kısa süreli santrifüj (3-5 saniye) uygulandıktan sonra 25°C'de 5 dakika inkubasyon uygulanmıştır ve tüplerin içine 1 µl M-MuLV reverse transcriptase eklenerek toplam 20 µl hacme ulaşılmıştır. Karışım daha sonra 25°C'de 10 dakika, 42°C'de 60 dakika ve 70 °C'de 10 dakika inkubasyona bırakılarak cDNA sentez aşaması tamamlanmıştır (Fermentas, Ukraine).

PCR işlemi Fermentas firmasının önerdiği prosedüre göre 50 µl hacimde yapılmıştır. RT-PCR testlerinde kullanılan primerler, baz uzunlukları ve kullanılan sıcaklık döngüleri Çizelge 2'de verilmiştir. Steril PCR tüplerine 25 µl 2 X PCR master mix, 1 µl primer1, 1 µl primer 2, 2 µl cDNA ve 21 µl nuclease free su eklenmiştir. Tüpler PCR cihazına yerleştirilerek test edilecek virüs için spesifik olan program uygulanmıştır (Candresse ve ark., 1995). Tüm işlemler boyunca eldiven kullanılmış ve herhangi bir kontaminasyon olasılığını belirlemek için de nükleik asit

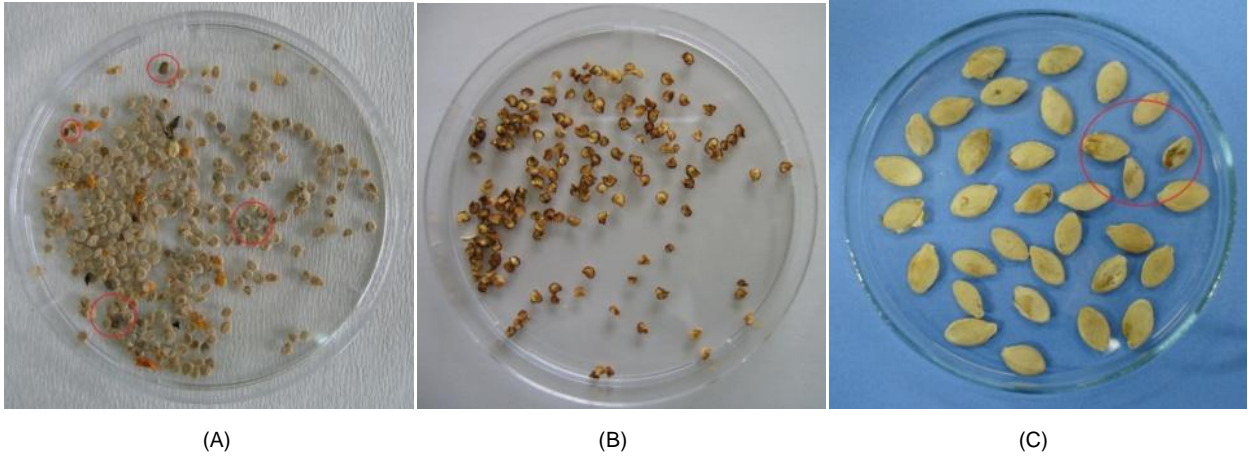
eklemeden sadece karışımın yer aldığı bir tüpte (kontrol) PCR programında çoğaltma işlemine alınmıştır. Son olarak, PCR cihazında çoğaltılan ürünler 100 V'da 60 dk süreyle elektroforeze tabi tutulmuş ve ethidium bromide ile boyanarak DNR Bio-Imaging marka Jel Dokümantasyon ve Analiz Sistemi ile fotoğrafı çekilerek görüntülenmiştir.

**Çizelge 2.** RT-PCR Testlerinde kullanılan primerler, baz uzunlukları ve sıcaklık döngüleri

Hedef Virüs / Primer	Primer Dizilimi	Baz Uzunluğu	PCR Döngüleri
AMV-F AMV-R	GTGGTGGGAAAGCTGGTAAA CACCCAGTGGAGGTCAGCATT (Martinez et al., 2004)	700 bp	1 X (94°C 2 dk.), 35 X (94°C 30sn. / 54 °C 30sn. / 72°C 30sn) 1 X (72°C 10dk.)
ArMV-1 ArMV-2	TTGGCCCAGATATAGCGTAAAAAT CAGCGGATTGGGAGTTCGT (MacKenzie et al., 1997)	519 bp	1 X (94°C 2 dk.), 35 X (94°C 30sn. / 50 °C 45sn. / 72°C 60sn) 1 X (72°C 5dk.)
CGMMV-1 CGMMV-2	GTTTCGCCTCAAAATTCC TCTAAATATGACAAGTCGC (Moreno et al., 2004)	359 bp	1 X (98°C 60sn.) 35 X (98°C 10sn. / 63 °C 20sn. / 72°C 60sn) 1 X (72°C 5dk.)
CMV-F CMV-R	ATGGACAAATCTGAATCAAC TCAAAC TGGGAGCACCC (Bhat et al., 2005)	650 bp	1 X (94°C 1 dk.) 40 X (94°C 30sn. / 50 °C 60sn. / 72°C 60sn.) 1 X (72°C 10dk.)
PVY-1 PVY-2	AAGCTTCCATACTACCCGC CATTTGTGCCCAATTGCC (Nie and Singh, 2002)	856 bp	1 X (94°C 2 dk.) 35 X (94°C 30sn. / 58 °C 45sn. / 72°C 30sn) 1 X (72°C 10dk.)
SqMV-F SqMV-R	ATGGCTTCCATCGTCTCATCCGCC CATGGTACAGCAGCTTGGAACTTATATTC CA (Yoo et al., 2004)	500 bp	1 X (95°C 5 dk.) 35 X (94°C 30sn. / 60 °C 30sn. / 72°C 90sn) 1 X (72°C 7dk.)
TMV-1 TMV-2	GAC CTG ACA AAAATG GAG AAG ATC GAA AGCGGA CAGAAA CCC GCT (Silva et al., 2008)	422 bp	1 X (94°C 2dk.) 35 X (94°C 30sn. / 62 °C 45sn. / 72°C 60sn.) 1 X (72°C 5dk.)
TSV-1 TSV-2	ACGAGTATTAAGTGGATGAATTCT ACTTACAATACGTCGAGGTGTG (Tzanetakakis et al., 2004)	897 bp	1 X (94°C 1 dk.) 40 X (94°C 30sn. / 55°C 90sn. / 72°C 60sn.) 1 X (72°C 10dk.)
TBRV-1 TBRV-2	ATGGGAGAAGTGCTGG AATCTTTTTGTGTCCAACA (Le Gall et al., 1995)	333 bp	1 X (92°C 1 dk.) 35 X (92°C 1 dk. / 42 °C 1dk. / 72°C 2dk.) 1 X (72°C 10dk.)
ToMV-5 ToMV-6	CTC CAT CGT TCA CAC TCG TTA CT GAT CTG TCA AAG TCT GAGAAA CTT (Silva et al., 2008)	508 bp	1 X (94°C 2dk.) 35 X (94°C 30sn. / 62 °C 45sn. / 72°C 60sn.) 1 X (72°C 5dk.)
ToRSV-1 ToRSV-2	GACGAAGTTATCAATGGCAGC TCCGTCCAATCACGGAATA (Griesbach et al., 1995)	449 bp	1 X (94°C 4dk.) 40 X (94°C 60sn. / 55 °C 60sn. / 72°C 2 dk.) 1 X (72°C 10dk.)
TRSV-F TRSV-R	CTTGGCGCCAAATCTATAA ACTTGTGCCAGGAGAGCTA (Walter and Zitter, 2003)	348 bp	1 X (94°C 2 dk.) 35 X (94°C 30sn. / 53 °C 30sn. / 72°C 60sn) 1 X (72°C 7dk.)
TSWV-F TSWV-R	AATTGCCTTGCAACCAATTC ATCAGTCGAAAT GGTCGGCA (Mumford et al. 1994)	276 bp	1 X (94°C 5 dk.) 30 X (94°C 60sn. / 55 °C 60sn. / 72°C 60sn) 1 X (72°C 10dk.)
ZYMV-1 ZYMV-2	CATCGAGTTGTTTGGTCTTGA GCAGTGTGCCGTTCAAGTGTCT (Zeng et al., 2007)	66 bp	1 X (94°C 2 dk.) 35 X (94°C 30sn. / 57 °C 45sn. / 72°C 60sn) 1 X (72°C 7dk.)
WMV-1 WMV-2	ATTCCTCTGAGGGATACAG TTGACAGTTGGGTATCACGT (Desbiez and Lecoq, 2004)	500 bp	1 X (94°C 4dk.) 35 X (94°C 60sn. / 55 °C 60sn. / 72°C 2 dk.) 1 X (72°C 10dk.)

### SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Araştırma kapsamında yer alan değişik sebzelerin tohumlarında yapılan görsel incelemelerde, tohum renginde değişme, tohum büyüklüğünde azalma, şekil bozuklukları, buruşma, beneklenme ve tohum kabuğunda nekroz gibi anormallikler bulunduğu belirlenmiştir. Tohumların simptomatolojik açıdan incelenmesi diğer tanılama yöntemleri için sadece bir ön basamak oluşturmaktadır. Bunun yanında, tohumlardaki anormalliklerin viral etmenlerden kaynaklı olabileceği sonucunun yanı sıra diğer patojenler ya da etkenler tarafından oluşturulabileceği bilinmektedir (Erkan, 1998). Bununla beraber, hiç belirti göstermeyen ve görünüm olarak sağlıklı olan tohumlarda da virüs enfeksiyonu olabildiği daha sonra yapılan testler sonucunda gözlemlenmiştir. Örneğin, Domates 3, Domates 8, Domates 18, Hıyar 1 ve Biber 3 örneklerinde tohumda belirti görünmesine karşın diğer testlerle virüs saptanamazken, 1, 2, 9, 10, 12, 15, 17, 20 numaralı domates, 2 ve 3 numaralı karpuz, 1 ve 3 numaralı kavun, 2 ve 5 numaralı biber ve 2 numaralı kabak örneklerinin tohumlarında hiçbir simptomatolojik belirti olmamasına rağmen diğer test yöntemleriyle çeşitli virüsler saptanmıştır (Çizelge 3). Bazı sebze tohumu örneklerinde gözlenen belirtiler Şekil 1’de görülmektedir.



**Şekil 1.** Bazı sebze tohumu örneklerinde gözlenen belirtiler (A)Domates tohumlarında gözlemlenen renk değişiklikleri ve şekil bozukluğu belirtisi, (B) Biber tohumlarının büyüklüklerinde azalma ve tohum kabuğunda nekroz belirtileri, (C) Kabak tohumlarında gözlemlenen renk değişiklikleri ve şekil bozukluğu belirtisi.

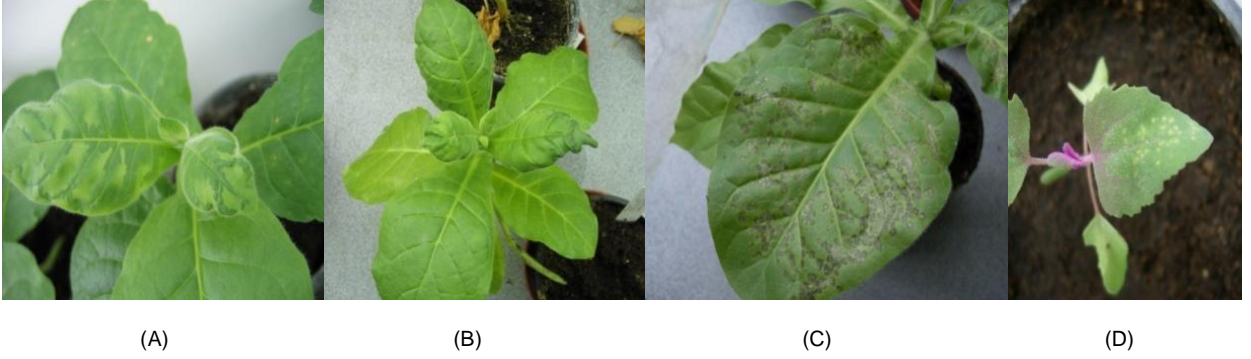
Simptomatolojik olarak incelenen tohum örneklerine serolojik yöntemlerden DAS-ELISA testi uygulanmıştır. Bunun sonucunda domates tohumlarında TMV, ToMV, CMV etmenleri ile TMV+ToMV+CMV, TMV+CMV, ToMV+CMV, TMV+ToMV şeklindeki karışık enfeksiyonlar, biber tohumlarında TMV, ToMV, CMV etmenleri ile TMV+ToMV+CMV, TMV+ToMV şeklinde enfeksiyonlar, karpuz tohumlarında CMV saptanmıştır. Ayrıca, kavun tohumlarında CMV, SqMV ve CMV+SqMV, hıyar ve kabak tohumlarında CMV enfeksiyonları belirlenmiştir. DAS-ELISA testleri sonucunda virüslerle enfekteli oldukları belirlenen veya virüs saptanmayan tüm tohum örnekleri test bitkilerine verilerek biyolojik endeksleme çalışmaları yürütülmüştür. Bunun sonucunda DAS-ELISA testi sonucunda enfekteli bulunan ve test bitkilerine inokulasyon uygulaması yapılan tüm örnekler test bitkilerinde belirti vermiştir (Çizelge 3). Tohum örneklerine gerçekleştirilen biyolojik testler sonucunda test bitkilerinde gözlenen simptomlar önceki yıllarda bu konuda gerçekleştirilen mekanik inokulasyon uygulamaları ile paralellik göstermektedir (Neergard, 1972). Mekanik inokulasyonlar sonucunda bazı test bitkilerinde oluşan belirtilere ait kayıt edilmiş fotoğraf örnekleri Şekil 2’de gösterilmiştir.

Çizelge 3. Virüs tanılama yöntemlerinin karşılaştırılmalı sonuçları

No	Örnek No. / Sebze Türü	RT-PCR	DAS-ELISA	Test Bitkilerine İnokulasyon	Simptomatoloji
1.	Domates 1	+	+	+	
2.	Domates 2	+	+	+	
3.	Domates 3				X
4.	<b>Domates 4 (S)</b>				
5.	Domates 5	+	+	+	+
6.	Domates 6	+ (CMV)			
7.	<b>Domates 7 (S)</b>				
8.	Domates 8				X
9.	Domates 9	+	+	+	
10.	Domates 10	+	+	+	
11.	<b>Domates 11 (S)</b>				
12.	Domates 12	+	+	+	
13.	<b>Domates 13 (S)</b>				
14.	<b>Domates 14 (S)</b>				
15.	Domates 15	+	+	+	
16.	<b>Domates 16 (S)</b>				
17.	Domates 17	+	+	+	
18.	Domates 18				X
19.	Domates 19	+	+	+	+
20.	Domates 20	+	+	+	
21.	Karpuz 1	+	+	+	+
22.	Karpuz 2	+	+	+	
23.	Karpuz 3	+	+	+	
24.	<b>Karpuz 4 (S)</b>				
25.	<b>Karpuz 5 (S)</b>				
26.	Kavun 1	+	+	Uygulanmadı	
27.	<b>Kavun 2 (S)</b>			Uygulanmadı	
28.	Kavun 3	+	+	Uygulanmadı	
29.	<b>Kavun 4 (S)</b>			Uygulanmadı	
30.	<b>Kavun 5 (S)</b>			Uygulanmadı	
31.	Hıyar 1				X
32.	Hıyar 2	+	+	+	+
33.	Hıyar 3	+	+	+	+
34.	<b>Hıyar 4 (S)</b>				
35.	<b>Hıyar 5 (S)</b>				
36.	<b>Biber 1 (S)</b>				
37.	Biber 2	+	+	+	
38.	Biber 3				X
39.	Biber 4	+	+	+	+
40.	Biber 5	+	+	+	
41.	Kabak 1	+	+	Uygulanmadı	+
42.	Kabak 2	+	+	Uygulanmadı	
43.	<b>Kabak 3 (S)</b>			Uygulanmadı	
	<b>Viral Etmenlerin</b>	23/23	22/23	18/19	7/23
	<b>Saptanmasındaki Başarı Oranı</b>	<b>%100</b>	<b>%96</b>	<b>%95</b>	<b>%30</b>

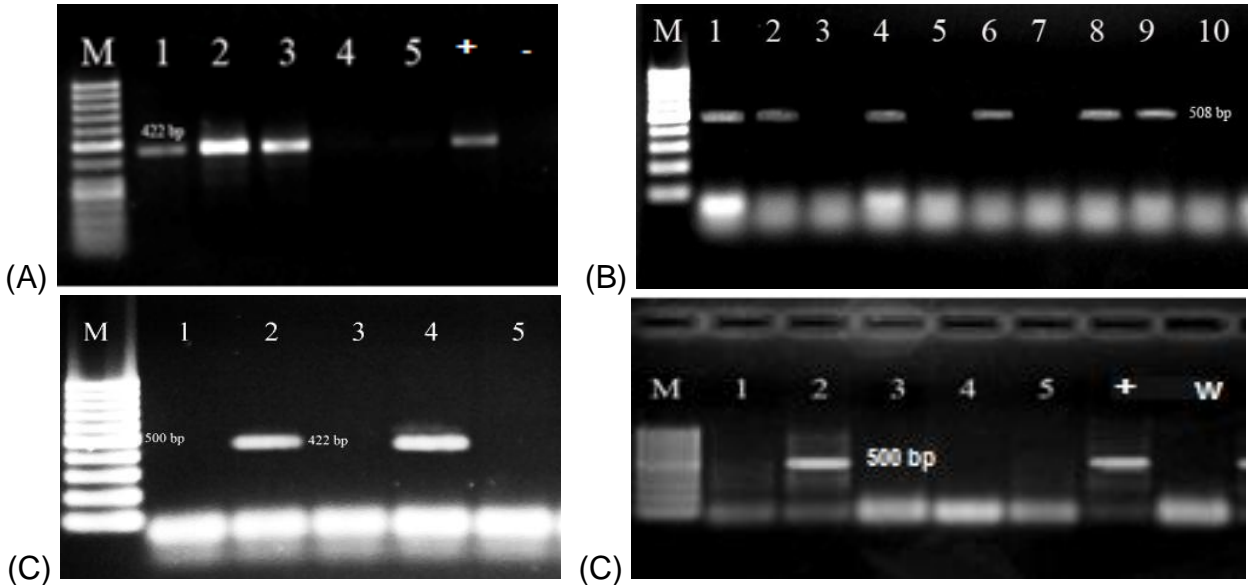
## THE COMPARISON OF THE SENSIVITY OF VIRAL DETECTION METHODS IN CERTAIN VEGETABLE SEEDS

X: Belirti göstermesine karşın virüs saptanmayan tohum örneği  
S: Testler sonucunda viral enfeksiyon bulunamayan örnek  
+: Viral enfeksiyon tespit edilen örnek



**Şekil 2.** Mekanik inokulasyonlar sonucunda bazı test bitkilerinde oluşan belirtiler (A) *N. tabacum* cv. Maden bitkisi yapraklarında CMV ile enfekteli tohumlardan gerçekleştirilen mekanik inokulasyonlar sonucunda oluşan deformasyonlar ve sistemik lezyonlar, (B) *N. tabacum* cv. Maden bitkisinde ToMV ile enfekteli tohumlardan gerçekleştirilen mekanik inokulasyonlar sonucunda oluşan yaprak deformasyonları ve mozaik belirtisi, (C) *N. tabacum* cv. Xanthi bitkisi yapraklarında TMV ile enfekteli tohumlardan gerçekleştirilen mekanik inokulasyonlar sonucunda inokulasyondan 5 gün sonra kayıt edilen nekrotik lokal lekeler ve yaprak deformasyonları, (D) *Chenopodium amaranticolor* bitkisi yapraklarında ZYMV ile enfekteli tohumlardan gerçekleştirilen mekanik inokulasyonlar sonucunda oluşan klorotik lokal lekeler

Domates 6 numaralı tohum örneği hariç diğer tüm tohum örneklerinde, DAS-ELISA testi ile belirlenen viral etmenler RT-PCR çalışmalarında da belirlenmiştir (Şekil 3). Domates 6 tohum örneği ise DAS-ELISA ve diğer testlerde negatif sonuç verirken, RT-PCR çalışmalarında CMV açısından pozitif bulunmuştur. 43 örneğin toplamda 23 tanesinde viral enfeksiyon belirlenmiştir.



**Şekil 3.** Tohum örneklerine uygulanan bazı PCR testlerinin jel görüntüleme cihazında çekilmiş fotoğrafları (A) Domates tohumlarında TMV için uygulanmış olan RT-PCR testi sonucunun jel görüntüsü, (B) Domates tohumlarında ToMV için uygulanmış olan RT-PCR testi sonucunun jel görüntüsü, (C) Biber tohumlarında TMV için uygulanmış olan RT-PCR testi sonucunun jel görüntüsü, (D) Kavun tohumlarında SqMV için uygulanmış olan RT-PCR testi sonucunun jel görüntüsü.



Sonuç olarak, değişik bitkilere ait tohum örneklerinin deneme sonuçları baz alınarak yapılan karşılaştırmalarda tanılama yöntemleri arasında RT-PCR yöntemi; denemelerde tüm yöntemlerle belirlenen pozitif örneklerin tamamını saptayarak tanılamada %100 oranında bir başarı sağlamıştır. DAS-ELISA yönteminde %96 oranında başarı sağlanırken, test bitkilerine inokulasyon yönteminde bu oran %95 olarak saptanmıştır. Karşılaştırmada kullanılan pozitif örneklerin %30'unda da viral simptomlar gözlemlenmiştir (Çizelge 3). Test bitkilerine inokulasyon yöntemi ile DAS-ELISA testleri arasında %1 gibi az bir fark gözükse de mekanik inokulasyonda sadece belirti açısından bir değerlendirme yapıldığı ve DAS-ELISA testlerinde olduğu gibi örneğin hangi viral etmen ile enfekteli olduğu konusunda net sonuçlar alınamayacağı göz önünde bulundurulmalıdır. Ayrıca, kullanılan yöntemlerin duyarlılık durumlarının incelenen “virüs X tohum türü” kombinasyonuna bağımlı olarak değişme gösterebileceği dikkate alınmalıdır. Daha önce yapılan araştırmalarda da benzer sonuçlar elde edilmiştir. Sertifikalı domates çeşitlerine ait domates tohumları ile yapılan bir çalışmada tanılama yöntemleri karşılaştırılmış ve ELISA testleri ile mekanik inokulasyon yönteminin %100 oranında, bitki yetiştirme yönteminin %94 oranında ve makroskobik gözlemlerin %34 oranında tanılamada başarılı olduğunu belirtilmiştir (Değirmenci ve Açıkgoz, 2005). Bu sonuçlar ışığında viral etmenleri tanılamada kullanılan yöntemler arasında moleküler yöntemlerden PCR testleri en güvenilir yöntem olarak karşımıza çıkmaktadır. Güvenilir olması gibi avantajlarının yanında, moleküler testlerin çok dikkat gerektiren, pahalı ve zahmetli yöntemler olması da göz önünde bulundurulması gereken konular arasındadır. DAS-ELISA testleri de yüksek başarı oranı, çok sayıda örneği aynı anda test edebilme imkânı ve kısa sürede sonuç vermesi gibi özellikleri ile öne çıkan tanılama yöntemleri arasında yer almaktadır. Ayrıca, yapılacak çalışmalarla üretimde yaygın olarak kullanılan bazı sebze tohumlarında bulunan virüslerin tür bazında daha ayrıntılı biçimde ortaya konulması önem taşımaktadır ve bu konudaki araştırmalara öncelik verilmesi zorunludur.

## **BAZI SEBZE TÜRLERİNİN TOHUMLARINDAKİ VİRAL ETMENLERİN SAPTANMASI AMACIYLA KULLANILAN YÖNTEMLERİN DUYARLILIK DURUMUNUN KARŞILAŞTIRILMASI**

### **ÖZET**

Bu çalışmada ülkemizde taze tüketim ve tohumluk üretimi için önemli olan bazı sebze türlerinin tohumlarındaki viral hastalık etmenlerinin varlığını belirlemek amacıyla kullanılan yöntemlerin duyarlılık durumunun karşılaştırılması amaçlanmıştır. Araştırma için firma ve üreticilerden 43 adet tohum örneği toplanmış ve bu örneklerdeki viral etmenlerin tanılanmasında biyolojik, serolojik ve moleküler yöntemlerden yararlanılmıştır. Yapılan denemelerden elde edilen sonuçlara göre kullanılan tüm yöntemlerle 15 tohum örneğinde (ELISA, RT-PCR, test bitkilerine inokulasyon ve simptomatoloji) herhangi bir viral enfeksiyon olmadığı saptanırken, 5 tohum örneğinde ise görsel olarak belirti bulunmasına rağmen viral etmen enfeksiyonu olmadığı görülmüştür. Yürütülen çalışmalar sonucunda, toplam 23 tohum örneğinde viral etmenlerin olduğu belirlenirken, RT-PCR yöntemi ile virüsler ile enfekteli olan bu 23 örneğin tamamı (%100), DAS-ELISA yöntemi ile 22'si (%96), test bitkilerine inokulasyon yöntemi ile uygulamaya alınan 19 enfekteli örneğin 18'i (%95) saptanabilirken, 23 enfekteli örneğin 7'sinde de (%30) viral simptomlar olduğu gözlemlenmiştir.

**Anahtar Sözcükler:** Sebze, tohum, virüs, tanılama yöntemi

### **LİTERATÜR LİSTESİ**

Bhat, A.I., S. Devasahayam, M.N.Venugopal, and R.Suseela-Bhai, 2005. Distribution and incidence of viral diseases of black pepper in Karnataka and Kerala, India. J. Plantation Crops 33: 59–64.

THE COMPARISON OF THE SENSIVITY OF VIRAL DETECTION METHODS IN  
CERTAIN VEGETABLE SEEDS

- Candresse, T., T. Lanneau, F. Revers, N. Grasseau, G. Macquare, S. German, T. Malinowsky, and J. Dunez, 1995. An immunocapture PCR assay adapted to the detection and the analysis of the molecular variability of apple chlorotic leaf spot virus. *Acta Horticulture* 386:136-147.
- Carroll, T.W., 1983. Certification schemes against barley stripe mosaic. *Seed Science and Technology* 11: 1033-1042.
- Clark, M.F., and A.N. Adams, 1977. Characteristic of Microplate Method of Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Detection of Plant Viruses. *J. Gen. Virol.*, 34: 475-483.
- Çiçek, Y. and Ü. Yorgancı, 1991. Studies on the Incidence of Tobacco Mosaic Virus on Sertified Seed of Tomato, Pepper and Eggplant in Aegean Region. *J. Turk. Phytopath.*, 20 (2-3): 57-68.
- Değirmenci, N.F. ve S. Açıkgöz, 2005. Aydın ilinde yaygın olarak kullanılan sertifikalı domates tohumlarındaki bazı viral etmenlerin saptanmasında biyolojik ve serolojik yöntemlerin kullanılması. Türkiye II. Tohumculuk Kongresi, Adana, s. 379-380.
- Desbiez, C. and H. Lecoq, 2004. The nucleotide sequence of *Watermelon mosaic virus* (WMV, Poty virus) reveals interspecific recombination between two related poty viruses in the 5 part of the genome. *Arch. Virol.* 149: 1619-1632
- Die, 2011a. Devlet İstatistik Enstitüsü. Türkiye İstatistik Yıllığı (Turkey's Statistical Yearbook) 2009 (syf:198).
- Die, 2011b. Devlet İstatistik Enstitüsü. İstatistiksel Göstergeler (Statistical Indicators) 1923-2009 (syf:178-179).
- Erkan, S., 1998. Tohum Patolojisi. E. Ü. Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü, Bornova, İzmir. Gözdem Ofis, 275 S.
- Erkan, S., M. Gümüş, H. Türküsay ve İ. Duman, 1995. Sanayi Domatesi Çeşitlerine Ait Tohum Örneklerinde Tohum Kaynaklı Bazı Hastalık Etmenlerinin Bulunma Durumunun Saptanması Üzerinde Araştırmalar.
- Faostat, FaoStatistics Division 2011. (Erişim Tarihi: 25 Mart 2011). <http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567#ancor>.
- Foissac, X., L.Svanella-Dumas, M.J.Dulucq, P. Gentit and T.Candresse, 2001. Polyvalent detection of fruit tree Tricho, Capillo and Foveaviruses by nested RT-PCR using degenerated and inosine containing primers (PDO RT-PCR). *Acta Hort* 550:37 – 43.
- Griesbach, J.A., 1995. Detection of tomato ringspot virus by polymerase chain reaction. *Plant Disease* 79:1054-1056.
- Gümüş, M., 1998. İzmir İlinde Biberlerdeki Viral Hastalık Etmenlerinin ve Oranlarının Saptanması ve Bazı Biber Çeşitlerinin Bu Virüslere Reaksiyonların Belirlenmesi Üzerine Araştırmalar, Doktora Tezi, Ege Üniversitesi, Ziraat fak., Bornova, İzmir, 1998.
- Ista, 2007. <http://www.seedtest.org/en/home.html> (Erişim Tarihi: 2007).
- Le Gall, O., T. Candresse and J. Dunez, 1995. Transfer of the 31 non-translated region of grapevine chrome mosaic virus RNA-1 by recombination to tomato black ring virus RNA-2 in pseudorecombinant isolates. *Journal of General Virology* 76: 1285-1289.
- Mackenzie, D.J., M.A. Mclean, S. Mukerji, and M. Green, 1997. Improved RNA extraction from woody plants for the detection of viral pathogens by reverse transcription-polymerase chain reaction. *Plant Disease* 81: 222-226.
- Martínez-Priego, M., C.Córdoba, and C.Jordá, 2004. First Report of *Alfalfa mosaic virus* in *Lavandula officinalis*, *Disease Notes* 88 (8):90.
- Matthews, R.E.F., 1991. *Plant Virology*, 3rd ed. Acad. Pres, New York, 897 p.
- Moreno, I.M., J.R. Thompson, and F. Garcia-Arenal, 2004. Analysis of the systemic colonization of cucumber plants by *Cucumber green mottle mosaic virus*. *Journal of General Virology* 85:749-759.

- Mumford, R.A.,I. Barker, and K.R. Wood, 1994. The detection of tomato spotted wilt virus using the polymerase chain reaction. *J. Virol. Methods* 46: 303- 311.
- Neergard, P.,1972. International and national cooperation in seed health testing and certification.*Proc.Int. Seed Test.Ass.* 37: 117-138.
- Nie, X., and R.P. Singh, 2002. A new approach for the simultaneous differentiation of biological and geographical strains of potato virus Y by uniplex and multiplex RT-PCR. *J. Virol. Meth.* 104: 41-54.
- Nienhaus, F., 1976. *Lehrbuch der Phytomedizin*. Verlag Paul Parey, Berlin und Hamburg, 490 p.
- Nogay, A., 1983. Marmara bölgesi cucurbitaceae familyası kültür bitkilerinde görülen virüs hastalıklarının tanılanması, tohumla geçiş durumlarının ve konukçu dizilerinin saptanması üzerinde araştırmalar. (Doktora tezi). Erenköy- İstanbul,120s.
- Noordam, D.,1973, Identification of Plant Viruses, Methods and Experiments, PUDOC, Wageningen, the Netherlands, 208p.
- Riedle-Bauer, M.,B.Suarez, and H.J. Reinprecht, 2002. Seed transmission and natural reservoirs of patojen *Zucchini yellow mosaic virus* in *Cucurbita pepo* var. *styriaca*. *Journal of Plant Diseases and Protection* 109: 200-206.
- Silva, R.M.,E.R. Souto, J.C. Pedroso, R. Arakava, A.M. Almeida, A.Barboza, and J.Vida, 2008. Detection and Identification of TMV Infecting Tomato Under Protected Cultivation in Paraná State.*Brazilian Archives Of Biology And Technology, An International Journal* 51 (5): 903-909.
- TSÜAB, 2010. TSÜAB-TÜRKTED Ortak Çalışma Grupları Grup Raporları, Ankara, 112s.
- Tzanetakis, I.E., I.C. Mackey, and R.R. Martin, 2004. Strawberry necrotic shock virus is a distinct virus and not a strain of *Tobacco streak virus*. *Arch Virol.* 149: 2001–2011.
- Walter, S. A.,and T.A. Zitter,2003. Compendium of cucurbit diseases.*HortScience* 38 (65):42.
- Yoo, B.C.,F. Kragler, E. Varkonyi-Gasic, V. Haywood,S. Archer-Evans, Y.M. Lee, T.J.Loughand W.J. Lucas, 2004. A Systemic Small RNA Signaling System in Plants. *American Society of Plant Biologist, The Plant Cell* 16: 1979-2000.
- Yorgancı, Ü.,1975. İzmir İlinde Domateslerdeki Virüs Hastalıkları, Yayılma ve Zarar Durumları, Elde Edilen İzolatlarla Biyolojik ve Serolojik Araştırmalar (Doçentlik Tezi). TOAG/127 No'lu Proje Nihai Raporu. Ege Üniv. Ziraat Fak. Bornova-İzmir. 102 s.
- Zeng, R., Q. Liao, J. Feng, D. Li, and J. Chen, 2007. Synergy between *Cucumber mosaic virus* and *Zucchini yellow mosaic virus* on *cucurbitaceae* hosts tested by Real-Time Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica* 39(6): 431–437.

